

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Голденковой-Павловой Ирины Васильевны на диссертационную работу Бережневой Зои Александровны на тему «Роль генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при абиотическом стрессе», представленную в диссертационный совет 24.2.479.01, созданного на базе ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Актуальность работы

Механизмы контроля живых организмов как для поддержания гомеостаза в нормальных условиях жизнедеятельности, так и при действии различных стрессовых факторов является предметом исследования во многих странах. Интерес к изучению механизмов стрессового ответа основан на том, что такие механизмы важны для неподвижных организмов, поскольку этот тип организмов не способен выжить, если не их способность справиться с изменениями окружающей среды. Современные данные свидетельствуют о сложности механизмов поддержания гомеостаза в норме и ответных реакций растений на стрессовые воздействия. Большой успех в этой области исследований достигнут с использованием совокупности классических и современных методов молекулярной биологии, биохимии, физиологии и генетики, которые позволили идентифицировать и оценить изменение экспрессии многих генов. Понимание молекулярных механизмов биологических процессов требует поиска и изучения генов, белковые продукты которых вовлечены напрямую или косвенно в реализацию сложных защитных процессов. Методы поиска и исследования таких генов основаны на разных экспериментальных подходах. Многочисленные исследования убедительно продемонстрировали эффективность стратегии получения трансгенных растений, экспрессирующих целевой ген, для характеристики функций генов растений, по-разному представленных в разных тканях и в разных исследуемых процессах. Физиолого-биохимическая оценка количественного и качественного состава клеточных компонентов не только позволяет идентифицировать соединения, участвующие в тех или иных процессах жизнедеятельности растений, но также изучить их взаимодействие. Несмотря на значительные успехи, наши познания механизмов контроля на уровне целых организмов еще весьма ограничены. Так, идентификация ключевых генов, участвующих в стрессовом ответе, выявление ответов у организмов при стрессовых условиях, остаются первоочередными научными задачами. Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Диссертационная работа Зои Александровны Бережневой посвящена изучению вклада белковых продуктов генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляцию и обеспечение роста,

стрессоустойчивости растений, и оценке их влияния на компоненты антиоксидантной системы корней на модели трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

Научная новизна

Соискателем продемонстрировано влияние высокого уровня экспрессии гетерологичных генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз на параметры роста корней трансгенных растений, как при нормальных условиях, так и при воздействии ряда абиотических стрессовых факторов. Проведенные исследования впервые позволили получить убедительные данные о том, что высокий уровень экспрессии целевых генов способствует повышению устойчивости растений к кадмию, вероятно, за счет активации общей антиоксидантной способности растений, а также ее отдельных компонентов.

Характеристика содержания работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитированной литературы.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг проблем и включает 6 разделов.

В первом разделе соискатель излагает общие данные о морфофизиологические особенности корневой системы растений, описывая подробно морфолого-анатомические особенности корней и особенности деления клеток корня растений. На основе анализа современных литературных данных соискатель в следующих двух разделах приводит сведения о механизмах регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов, включая представления о фитогормональной и генетической регуляции роста корней, а также современное состояние вопроса о влиянии ряда стрессовых факторов абиотического происхождения на рост корней растений. На основе литературных данных в двух последующих разделах достаточно подробно описана роль генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов. В заключительном разделе Зоей Александровной описывается современное состояние вопроса взаимосвязи экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз с антиоксидантной системой растений.

В целом, обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается проблем, которые имеют отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются

соискателем вполне квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, в целом, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических современных методов, применяемых в мировой практике физиологических и биохимических исследований растений. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: автором была предпринята серия экспериментов, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает четыре раздела, при этом каждый представлен и подразделами.

Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные Зоей Александровной исследования базируются на гипотезе, сформулированной в лаборатории, в которой выполнено исследование, о том, что белковые продукты генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз вовлечены не только в регуляцию роста корней при нормальных условиях, но и играют важную роль в защитных ответах растений при действии ряда стрессовых факторов. В связи с этим, соискатель выбирает стратегию исследования, основанную на комплексном анализе трансгенных растений табака, которые отобраны на основании относительно высокого уровня транскрипции целевых генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корнях модельных растений.

Первоначально соискатель проводит сравнительный анализ содержания транскриптов генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корнях линий трансгенных растений табака, полученных в лаборатории ранее, в том числе и при участии диссертанта. Проведенный анализ позволил выбрать 3 линии трансгенных растений, экспрессирующих гены *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*, 4 линии – ген *AtEXPA10*, 6 линий – ген *PtrXTH1* и 8 линий – ген *PnEXPA3* для последующего комплексного анализа.

Первая часть экспериментов диссертанта направлена на оценку и сравнительный анализ ростовых показателей корней у выбранных линий трансгенных растений, как в нормальных условиях жизнедеятельности, так и при действии таких факторов среды как засоление, гипотермия и действие тяжелых металлов, на примере кадмия. В результате соискатель получает подтверждения, что при нормальных условиях и при действии кадмия прирост корней в линиях трансгенных растений, экспрессирующих гены

экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз существенно выше прироста корней контрольных растений. Дополнительно, продемонстрировано, что одна группа генов экспансинов *PnEXPA3* и *AtEXPA10* способствует увеличению длины корней трансгенных растений при засолении, тогда как ген ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* оказывает позитивный эффект на рост корней не только при засолении, но и при гипотермии. Используя метод микроскопии продемонстрировано, что повышенный рост корней трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз, в условиях кадмиевого стресса может обеспечиваться стимуляцией роста клеток растяжением.

Проведенные диссертантом ряд сравнительных экспериментов по оценке компонентов антиоксидантной системы контрольных и трансгенных растений табака в нормальных условиях жизнедеятельности и при действии абиотических факторов среды, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза, глутатион-S-трансферазы, восстановленного и окисленного глутатиона, содержания пролина, водорастворимых сахаров, позволили сделать ряд заключений: (а) экспрессия генов экспансинов в корнях трансгенных растений способствует увеличению общей антиоксидантной способности, активности глутатион-S-трансферазы и аскорбатпероксидазы в условиях кадмиевого стресса; (б) экспрессия генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корнях трансгенных растений способствует увеличению общей антиоксидантной способности и активности аскорбатпероксидазы в условиях кадмиевого стресса; (в) выявлены вариации по некоторым исследуемым компонентам антиоксидантной системы и других потенциальных защитных систем при экспрессии генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз разного происхождения в корнях трансгенных растений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа Зои Александровны Бережневой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о механизмах регуляции экспрессии генов растений, вовлеченных в процессы развития и стрессовых ответов. С практической точки данная работа интересна тем, что обнаруженные закономерности активации компонентов антиоксидантной системы у трансгенных растений могут быть полезны при разработке стратегии создания хозяйственно-ценных растений с увеличенной корневой системой, способных продолжать рост при действии стрессовых факторов, таких как засоление, гипотермия и загрязнение кадмием.

Достоверность и апробация полученных результатов

Использование для исследований классических и современных методов физиологии и биохимии растений, а также методов анализа экспериментального материала, в целом, подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Зои Александровны Бережневой, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Основные положения и результаты исследований по диссертации опубликованы в 5 статьях в престижных зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК, доложены на международных и российских научных форумах. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы и замечания

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. Вопрос и замечания о выбранных для экспериментов линиях трансгенных растений:

(а) в чем сходство и отличие белковых продуктов генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз, гены которых экспрессированы в растениях? (Такая информация, на наш взгляд, была бы крайне полезной, в том числе и для обсуждения полученных результатов в диссертационной работе);

(б) следовало привести схему Т-ДНК векторной конструкции, которая использована для создания трансгенных растений;

(в) Оценено ли у первичных трансформантов количество копий перенесенной Т-ДНК? Вполне возможно, что установленные отличия по ряду показателей могут быть результатом интеграции более, чем одной Т-ДНК последовательности в геном растений.

(г) Почему не оценены показатели относительного уровня транскрипции целевых генов с использованием метод количественной ПЦР (qPCR), по крайней мере, в линиях трансгенных растений, которые использованы для сравнительного анализа ростовых показателей корней, оценки антиоксидантной системы? Они могли бы помочь в интерпретации данных в отличиях между линиями по исследованным компонентам антиоксидантной системы и морфологическим показателям корней.

2. Диссертант указывает **«Перед началом эксперимента проводили измерение длины корней табака, а по окончании 10 дней эксперимента определяли прирост корней при норме и при действии различных стресс-факторов, по сравнению с изначальной длиной (раздел 2.11. Оценка параметров роста корней трансгенных растений табака на вертикально-ориентированных чашках Петри)»**, возникает вопрос - что считалось началом эксперимента – растения какого возраста?

3. В диссертации указано «Для последующих экспериментов было взято по 3 линии со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*, 4 линии – с *AtEXPA10*, **6 линий – с *PtrXTH1*** и 8 линий – с *PnEXPA3*», в дальнейшем данные по всем видам исследований **представлены только для 4 линий трансгенных растений, экспрессирующих *PtrXTH1***. С чем связан выбор только 4 из 6 линий, поскольку они были отобраны по относительно высокому уровню транскрипции целевых генов в корнях трансгенных растений?

4. На основании каких соображений (литературные данные или предварительная оценка) имитировали условия засоления с использованием в среде 50 мМ и 100 мМ NaCl?

5. В разделе «Положения выносимые на защиту» диссертант указывает «Сверхэкспрессия генов экспансинов в корнях способствует увеличению общей антиоксидантной способности, активности глутатион-S-трансферазы и аскорбатпероксидазы в условиях кадмиевого стресса». При этом, данные закономерности выявлены только для трансгенных растений, экспрессирующих в корнях гены *NtEXPA1* и *NtEXPA5* (они клонированы из растений табака!), но не для генов гетерологичного происхождения - *PnEXPA3* и *AtEXPA10*. Связано ли происхождение последовательности гена с его проявлением в растениях? Сходный вопрос и по генам ксилоглюканэндотрансгликозилаз, экспрессия которых в корнях трансгенных растений способствует увеличению общей антиоксидантной способности и активности аскорбатпероксидазы в условиях кадмиевого стресса - линии растений, экспрессирующие гены ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT* и *PtrXTH1*, которые имеют разное происхождение, и по некоторым исследуемым компонентам антиоксидантной системы и других потенциальных защитных систем различаются. С чем связаны эти вариации, по мнению диссертанта?

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения. Хотелось бы знать мнение диссертанта по этим вопросам.

По разделам диссертационной работе Зои Александровны Бережневой имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя.

По части «Обзор литературы»:

- В Обзоре литературы хорошо было бы привести рисунки и/или таблицы, в которых представляется суммированная информация по каждому из разделов.

- Обзор содержит слишком много детализированной информации, которая не относится к основным вопросам темы работы, в том числе и информацию, которая взята из известных учебников и учебных пособий.

Принципиальных замечаний по разделу «Материалы и методы» нет, однако есть ряд вопросов и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя:

- более рациональным было бы привести характеристику трансгенных растений, использованных в работе, чем перечисление реактивов, составов использованных стандартных растворов, в том числе буферных, зачастую приведенных без указания pH и ссылок на первоисточники. Эта информация была бы более уместной в Приложении к работе, что допускается при оформлении диссертационных работ.

Имеются по этому разделу замечания редакционного характера:

- «промотор вируса цветной капусты 35S CaMV» более корректно – промотор 35S РНК CaMV вируса мозаики цветной капусты;

- «рестрикционные эндонуклеазы» более профессионально – эндонуклеазы рестрикции;

- соискатель указывает «Реакция проходила в 30 мкл раствора для проведения ПЦР с добавлением 0.1 мкг ДНК и 1 единицы HS-Taq ДНК-полимераз», но не указано добавление праймеров и в какой концентрации они были использованы.

- подраздел 2.12. Фиксация и микроскопический анализ корней – более профессионально было бы озаглавить «Фиксация и анализ корней методом микроскопии».

- Подробное описание большинства методов, использованных для анализа состояния компонентов антиоксидантной системы трансгенных растений табака – определение супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, восстановленного и окисленного глутатиона, содержания пролина, водорастворимых сахаров, общего растворимого белка – просто дать ссылки, если метод использован как описано в первоисточнике, и/или указать модификацию, если таковая была использована.

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не вполне профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, диссертант часто использует термин «сверхэкспрессия», тем не менее не ясно какие конкретно значения можно отнести к сверхэкспрессии, лучше было использовать высокий уровень экспрессии.

- частая подмена термина «транскрипция» на термин «экспрессия». Транскрипция – это, безусловно, важный этап экспрессии генов, и ее эффективность вносит значительный вклад, однако транскрипция не единственный биологический процесс, определяющий преобразование наследственной информации от гена в функциональный продукт, прежде всего белок. Экспериментально доказано, что регуляция экспрессии проходит и на уровне трансляции.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы,

выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей только хорошее впечатление.

Заключение. Диссертационная работа Бережневой Зои Александровны «Роль генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при абиотическом стрессе», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений, по всем критериям отвечает требованиям, установленным пунктами 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент, руководитель лаборатории функциональной геномики, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, доктор биологических наук по специальности 03.00.15 – Генетика (биологические науки), доцент



Ирина Васильевна Голденкова-Павлова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
Адрес: 127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35,
тел. +7(499)678-53-56;
E-mail: irengold58@gmail.com

Подпись И.В. Голденковой-Павловой заверяю.

Ученый секретарь


Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук



Наталья Витальевна Щербакова

«06» мая 2024 года

Я, Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Бережневой Зои Александровны и их дальнейшую обработку.

«06» мая 2024 года  Ирина Васильевна Голденкова-Павлова